

실리마린의 용출개선 및 흰쥐에서의 생체이용률 평가

김정훈¹ · 장선우¹ · 권종원¹ · 김원배¹ · 최영욱[†]

¹동아제약 연구소, 중앙대학교 약학대학
(2002년 12월 25일 접수 · 2003년 3월 11일 승인)

Improved Dissolution Characteristics of Silymarin and Their Bioavailability in Rats

Jeong Hoon Kim¹, Sun Woo Jang¹, Jong Weon Kweon¹, Won Bae Kim¹ and Young Wook Choi[†]

¹Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd., Yong-In, Gyeonggi-do 449-905, Korea
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received December 25, 2002 · Accepted March 11, 2003)

ABSTRACT—Silybin is the main component of *Cardus marianus* extracts originated from *Silybum marianum* and has a hepato-protective effect. It is a water-insoluble compound and poorly absorbed from the gastrointestinal tract, resulting in very low oral bioavailability(BA). Polymeric mixed-micelle precursor formulation was made to enhance the dissolution rate of silybin, showing the results of pH-independent release profile with increased dissolution. Oral BA of different preparations in rats was evaluated, revealing that the new formulation showed increased BA more than 2-fold and 4-fold compared to the marketed product and *Cardus marianus* extracts itself, respectively.

Key words—Silymarin, Silybin, Micelle, Dissolution rate, Bioavailability

실리마린(*Cardus marianus*)은 엉겅퀴로 알려져 있는 *Silybum marianum*(일명: Milk Thistle, 국화과)으로부터 추출된 polyphenolic flavonoid로서 약리작용을 나타내는 활성 성분인 실리빈(silibin)과 그 외에 이성질체인 isosilybin, dihydrosilybin, silydianin, silychristin 등으로 구성되어 있다¹⁻³⁾(Figure 1).

실리마린은 간세포 보호효과가 있는 약물로서 만성간염 및 간경화 등의 간질환의 보조요법에 사용되며⁴⁻⁵⁾ 항산화제로서의 작용외에도 Kupffer세포를 억제하며, 간의 섬유화를 막고 항염증 작용도 있는 것으로 알려져 있으며 간장질환의 치료를 위해 유럽이나 아시아에서 널리 사용되고 있다. 또한 간 세포막에 있는 독성물질이 이들 수용체와 결합하여 세포막을 파괴하는 작용을 방해하여 세포를 안정시켜 간세포를 보호한다고 하며⁶⁾ 실리마린에 대해 알려진 주요 작용기전은 간세포 재생 촉진(단백질합성 증가), 항산화작용, 해독과정 증가(Cytochrome P450 저해, Phase II 증가), 항섬유화 작용, 항염증 작용, 담즙분비 및 배설 촉진 및 면역조절작용 등이다.

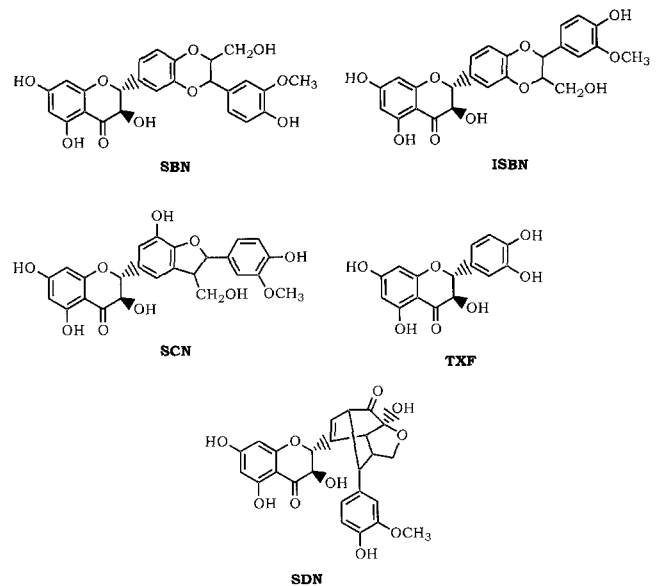


Figure 1—Chemical structures of silymarin flavonoids. SBN(Silybin), ISBN(Isosilybin), SCN(Silychristin), TXF(Taxiflofen), SDN(Silydianin).

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)820-5609, E-mail : ywchoi@cau.ac.kr

약동력학적⁴⁾으로는 혈중 최고농도에 도달하는 시간은 1.7-2.2 시간이며 혈중 최고농도 및 혈장 농도-시간 곡선하 면적

(AUC)은 용량에 비례하여 증가한다. 약 1-2%만이 요를 통하여 그리고 나머지는 담즙으로 배설된다. 평균체내잔존 시간은 약 5.5 시간 정도이며 소실 반감기는 약 4시간이다.

그러나, 실리마린은 물에 잘 녹지 않아 경구투여 후 흡수율이 매우 낮으며 생체이용률은 약 20-40%정도이다.⁷⁻¹²⁾ 본 연구에서는 고분자 혼합미셀전구체를 제조하여 카르두스 마리아누스 엑스(실리마린)와 시험제제 및 시판중인 대조제제에 대하여 실리빈의 비교용출율을 평가하였고 흰쥐에서의 생체이용률을 비교평가 하였다.

실험방법

시약 및 기기

실리빈($C_{25}H_{22}O_{10}$: 분자량 482.4)과 β -glucuronidase/arylsulfatase (Glucuronidase activity 100,000 unities/ml, arylsulfatase activity 5,000 unities/ml)는 Sigma사(USA)에서 구입하였다.

Naringenin(4,5,7-trihydroxyflavanone)은 Aldrich사(USA)에서 구입하였고 HPLC용 아세토니트릴은 Merck(Darmstadt, FRG)에서 구입하였으며, 기타 시약류는 시판되는 특급 또는 일급시약을 그대로 사용하였다.

HPLC System 은 Gynkotek system(Germany)을 Vacuum evaporator는 Savant(USA)를 사용하였다.

시험제제 및 대조약

주성분으로는 카르두스 마리아누스 엑스(실리마린)를 사용하고 계면활성제, 공용매 및 공중합체 폴리머를 사용하여 제조하였다. 계면활성제로는 트윈 및 크레모포아를 사용하고 공용매로는 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌글리콜을, 공중합체 폴리머로는 폴록사머를 사용하여 일정 농도로 균일하게 혼합, 가열하여 주성분을 투명하게 용해시켜 시험제제(New formulation, 연질캡셀)를 제조하였다. 대조약으로는 카르두스 마리아누스 엑스(Cardus marianus extracts, 실리마린)와 국내 B사에서 용출율을 개선시켜 시판되는 L제제(Market product, 경질캡셀)를 사용하였다.

용출시험

시험제제, 카르두스 마리아누스 엑스 및 대조제제에 대하여 USP 장치 2(패들법)를 사용하여 실리빈의 용출률을 측정하였다. 용출시험액으로는 pH 1.2(약전) 및 7.4(USP) 완충액을 각각 750 ml씩 사용하였으며 온도는 37°C, 교반속도는 100 rpm으로 하였다. 시험제제 및 대조제제는 실리빈으로서 60 mg(실리마린으로서 140 mg)을 함유하며 카르두스 마리아

누스 엑스 역시 실리빈으로서 60 mg에 해당하는 양을 취하여 시험하였다. 용출시험액은 아래의 혈장분석법과 유사한 방법으로 HPLC를 사용하여 분석하였다.

생체이용률 시험

시험동물은 250-300 g의 Sprague-Dowley계열의 수컷 흰쥐를 사용하였으며 시험제제와 대조제제 및 카르두스 마리아누스 엑스를 각각 실리빈으로서 60 mg/kg가 되도록 3 ml의 물에 현탁하여 경구 투여하였다. 시험동물은 각 시험군당 6 마리를 사용하였으며 약물을 투여하기 전에 미리 에테르로 마취시킨 뒤 해파린 처리한 카테터를 대퇴부 동맥에 삽입하였다. 약물 투약 전과 후 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 24시간째 혈액을 0.5 ml씩 취하였으며 취한 혈액은 바로 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 혈장을 분리하여 HPLC법으로 혈장중의 실리빈을 분석하였다. 실리빈은 이성질체로서 두개의 피이크의 면적을 합하여 정량하였다.

혈장 시료의 전처리 및 Silybin의 분석

혈장중 실리빈의 분석방법은 Martinelli(1991)¹⁾ 등의 방법을 기초로 하여 다음과 같은 HPLC법을 사용하였다. 실리빈 표준품을 메탄올에 녹여 0.5 mg/ml의 농도로 만들고 이를 순차적으로 희석하여 1~ 500 μ g/ml의 표준용액을 만들고 이 표준액 10 μ l를 90 μ l의 공 혈장에 가하여 혈장 0.1~50 μ g/ml의 혈장 표준액을 제조하였다.

동물시험으로부터 채혈한 혈장 및 혈장 표준액 100 μ l에 1 M(pH 5.6) Acetate buffer 100 μ l와 β -Glucuronidase/Arylsulfatase(Sigma, USA) 50 μ l를 가하고 37°C에서 2시간동안 가수 분해시킨 다음 0.5 M Borate buffer(pH 8.5) 200 μ l를 가하여 반응을 정지시키고 내부표준물질로서 Naringenin(5 μ g/ml) 100 μ l를 가한 다음 여기에 에테르 1.6 ml를 가하여 1분간 추출한 다음 원심분리 하여 상정액만 취한 다음 Vacuum evaporator를 사용하여 증발시키고 여기에 이동상 130 μ l를 가하여 2분간 vortexing한 다음 이중 100 μ l를 HPLC에 주입하여 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다.

Gynkotek HPLC System을 사용하였으며 Column은 Hichrom(C_{18} , 250 \times 4.6 mm), 이동상은 0.2 M KH_2PO_4 (pH 2.8)/메탄올(1:1, v/v)을 사용하였고 검출파장은 UV 288 nm, 유속은 1 ml/min, 주입량은 100 μ l로 하였다.

약물 속도론적 파라미터

최고혈중 농도(C_{max})와 최고혈중농도 도달시간(T_{max})은 혈중농도그래프로부터 직접 구하였으며, 혈중농도 곡선하면적(AUC_{0-8hrs})은 사다리꼴 공식에 따라 계산하였다. 시험제제의

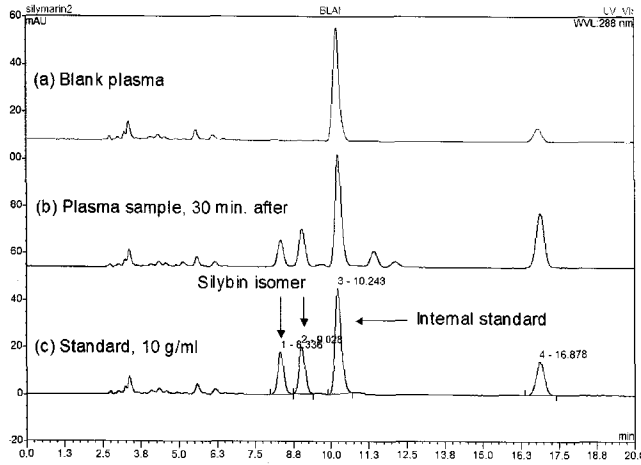


Figure 2—HPLC chromatogram of Silybin isomers, naringenin (internal standard) extracted from the rat plasma. (a) plasma blank, (b) plasma sample, 30 min after oral administration, (c) spiked plasma standard, 10 µl/ml.

AUC의 대조제제 및 카르두스 마리아누스 엑스의 AUC에 대한 비율로부터 상대 생체이용률(Relative Bioavailability : RBA)을 구하였으며, 최종적으로는 체내 약물농도 분석결과들을 Student's *t*-test를 이용하여 유의성($p < 0.05$)을 검정하였다.

결과 및 고찰

생체시료중 실리빈의 분석

Naringenin을 내부표준물질로 사용하여 얻은 크로마토그램을 Figure 2에 나타내었다. 실리빈이성질체 피크의 출현 시간은 8분 및 9분대에 나타났으며 내부표준 물질의 출현 시간은 10분대였으며 각 물질의 분리 상태는 양호하였다.

용출평가

실리마린 함유 제제의 전체적인 용출 패턴은 시험개시 1시간 이후에 정상에 도달하였으나 매질의 pH 및 제제에 따라 최소 10%에서 최대 90%의 용출율을 나타냄으로써 실리마린 제제는 특정 매질의 성질 및 제제설계 내용에 따라 용출률의 큰 차이가 존재함을 알 수 있었다. 실리빈으로서 60 mg 해당량의 카르두스 마리아누스 엑스를 충전한 경질 캡셀로부터 실리빈의 용출률은 pH 7.4 조건하에서 2시간이 경과한후 22%가 용출되었으며 특히 pH 1.2의 2시간 이후에서의 최대 용출률은 10%미만으로써 낮은 용출률을 나타내었다. 실리마린은 전체적으로 매우 난용성인 성질을 지니고 있으며 특히, 산성 조건하에서의 용출률이 매우 낮다. 따라서 본 성분의 용출개선의 목적은 산성조건하에서의 용출률의 개선이 매우 중요함을 알 수 있다. 대조제제는 당류, 수용성

폴리머 및 습윤제등으로 공침물을 형성 시켜 용해도와 용출율을 개선 한 제품으로써 현재 국내 시장에서 사용되고 있는 제제이다. 대조약의 실리빈의 용출률은 pH 7.4에서 10분 후 50%, 30분후에 70%, 2시간 후에는 약 80%로 증가하였으나 약물의 용해도가 떨어지는 pH 1.2에서는 2시간 경과후에도 20%미만의 용출률을 나타내었다. 고분자 혼합미셀 전구체 조성물을 함유한 연질캡셀인 시험제제의 경우는 pH 7.4에서 10분 경과후 약 80%, 1시간 경과 후에는 약 90% 정도로 초기용출 속도의 증가와 더불어 최대 용출률도 증가되었다. pH 1.2에서도 10분 경과후 약 60%, 1시간 경과 후에는 약 70%정도로 초기용출의 증가 더불어 산성용액에서의 급격한 용출률의 상승이 일어나는 것으로 나타났다. 시험제제가 카르두스 마리아누스 엑스에 비하여 용출속도 및 용출률이 증가한 것은 고분자 혼합미셀 전구체 조성물이 물과 접촉하면서 단시간 내에 미셀을 형성하기 때문인 것으로 보이며 시험제제가 대조제제에 비하여 pH에 따른 용출률의 차가 작은 것은 고분자 혼합미셀 전구체 조성물에 사용된 계면활성제 및 공중합체 폴리머가 pH에 변화에 영향을 받지 않기 때문인 것으로 보인다. 용출 평가 결과 대조제제에 비하여 산성조건 하에서의 용출률이 개선되었으며 이로써 위 장관내에서 신속하면서도 대량의 약물의 용출됨으로써 약물의 흡수율이 증가할 것으로 예상되었다(Figure 3).

생체이용률 평가

카르두스 마리아누스 엑스, 시험제제 및 대조제제를 흰쥐

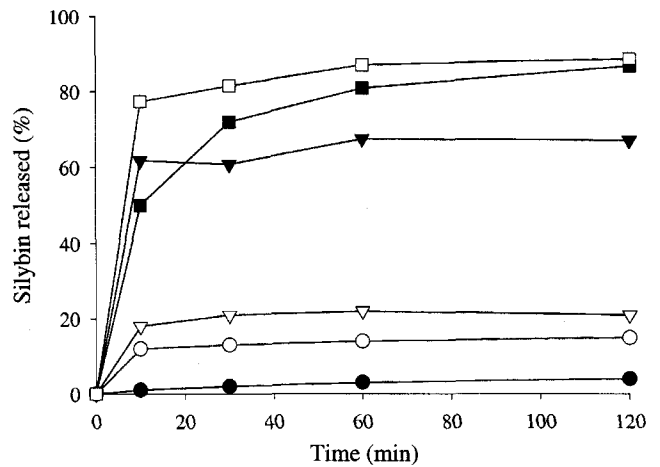


Figure 3—Dissolution rate profile of Silybin from the new formulation, Cardus marianus extracts and market product. Amount equivalent to 60 mg as Silybin was dissolved in 750 ml of buffer solution of pH 1.2 and 7.4. Keys; ▼, New formulation pH 1.2; □, New formulation pH 7.4; ○, Market Products pH 1.2; ■, Market product pH 7.4; ●, Cardus marianus extracts pH 1.2; ▽, Cardus marianus extracts pH 7.4.

Table I—Pharmacokinetic parameters of silybin administered orally at a dose of 60 mg/kg in rats.

	Cardus marianus extracts	Market product	New formulation
T _{max} (hr)	1.0±0.3	1.5±0.4	1.1±0.5
C _{max} (µg/ml)	9.0±2.7	12.6±2.5*	39.3±7.8*†
AUC _(0-8hrs) (µg/ml · hr)	24.6±7.4	48.4±13.5*	107.7±17.8*†

Data are expressed as by Mean±SD (n=6)

* : vs. Cardus Marianus extracts, p<0.05

† : vs. Market product, p<0.05

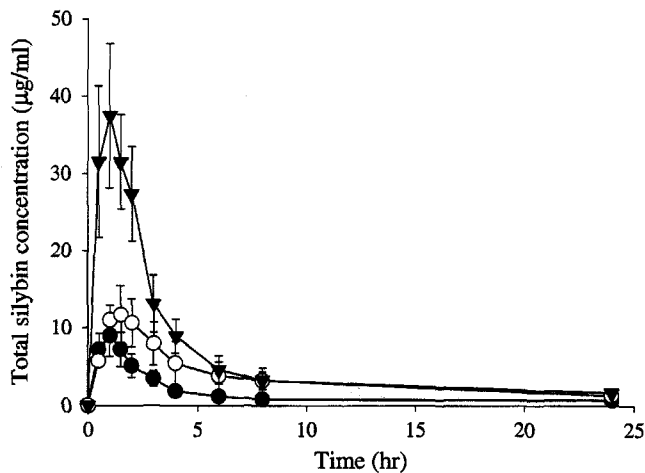


Figure 4—Time concentration profiles of plasma total Silybin (conjugated and unconjugated form) after oral administration at the dose of 60 mg/kg as Silybin in rat. Keys; ▼, New formulation; ○, Market product; ●, Cardus marianus extracts.

에 60 mg/kg로 경구 투여하였으며 실리빈은 해리형 실리빈 및 대사된 실리빈을 가수 분해하여 총 실리빈으로서 혈중 농도를 측정하였으며 혈중농도 분석결과 얻어진 약물속도론적 파라미터를 Table I에 나타내었다. 최고혈중농도 도달시간 (T_{max})은 1~1.5시간으로서 카르두스 마리아누스 엑스 및 제제간에 별다른 차이가 없었으며 세 가지 시료의 최고혈중농도 (C_{max})는 시험제제, 대조제제, 카르두스 마리아누스 엑스의 순으로 나타났고 시험제제 (39.3 µg/ml)는 카르두스 마리아누스 엑스 (9.0 µg/ml)에 비하여 4.4배, 대조제제 (12.6 µg/ml)에 비하여 3.1배 높은 것으로 나타났다. 경구투여 후 8시간까지의 혈중농도 곡선하 면적 (AUC_{0-8hrs})은 시험제제, 대조제제, 카르두스 마리아누스 엑스의 순으로 나타났고 시험제제 (107.7 µg/ml · hr)는 카르두스 마리아누스 엑스 (24.6 µg/ml · hr)에 비하여 4.4배, 대조제제 (48.4 µg/ml · hr)에 비하여 2.2 배 높은 것으로 나타났다 (Figure 4). 이러한 생체이용률의 증가는 전체적인 용출률의 상승에 따른 흡수율의 증가로 생각될 수 있으며, 특히 약물의 용출률이 산성조건하에서 매우

나쁜 경우는 그 pH 영역에서 용출 속도 및 최대 용출률을 상승시킴으로써 결과적으로 높은 생체이용률을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

결론

고분자 혼합미셀전구체인 시험제제를 제조하여 비교용출 시험을 한 결과 산성 및 알카리성 모든 영역에서 우수한 용출 양상을 나타내었으며 이로써 산성 조건인 위장관 내에서도 약물의 용출이 현저히 높아짐으로써 약물의 흡수가 증진될 수 있을 것으로 예측되었으며 흰쥐에서의 약물 동력학 평가 결과 생체이용률이 현저히 개선됨을 확인하였다. 따라서 추후 인체에서의 제형적 효과가 반영된 생체이용률의 평가 필요할 것으로 판단된다.

문헌

- 1) E. M. Martinelli, P. Morazzoni, S. Livio and E. Uberti, Liquid chromatographic assay of silybin in human plasma and urine, *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 1285-1296 (1991).
- 2) R. Weyhenmeyer, H. Mascher and J. Birkmayer, Study on dose linearity of the pharmacokinetics of silibinin diastereomers using a new stereospecific assay, *Int. J. Clin. Pharmacol., Ther. Tox.*, **30**, 134-138 (1992).
- 3) B. Rickling, B. Hans, R. Kramarczyk, G. Krumbiegel and R. Weyhenmeyer, Two high performance liquid chromatographic assays for the determination of free and total silibinin diastereomers in plasma using column switching with electrochemical detection and reversed phase chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B*, **670**, 267-277 (1995).
- 4) H. Salmi, and S. Sarna, Effect of silymarin on chemical, functional and morphological alterations of the liver. A double-blind controlled study, *Scand. J. Gastroenterol.*, **17**, 517-521 (1982).
- 5) P. Ferenci, B. Dragosics, H. Dittrich, H. Frank, L. Benda, H. Lochs, S. Meryn, W. Base and B. Schneider, Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver, *J. Hepatol.*, **9**, 105-113 (1989).
- 6) K. Parfitt, *Martindale, The complete drug reference*, 32nd Ed., Pharmaceutical Press, London, pp. 993-994 (1999).
- 7) G. Gatti and E. Perucca, Plasma concentrations of free and conjugated silybin after oral intake of a Silybin phosphatidylcholine complex (silipide) in healthy volunteers, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **32**, 614-617 (1994).
- 8) K. Hruby, G. Csomos, M. Fuhrmann and H. Thaler, Chemotherapy of amantia phalloid poisoning with intravenous silibinin, *Human Toxicol.*, **2**, 183-195 (1983).
- 9) P. Morazzoni, M. J. Magistretti, C. Giachetti, and G. Zanolo,

- Comparative bioavailability of silipide, a new flavanolignan complex in rats, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 39-44 (1992).
- 10) D. Lorenz, P. W. Lucker, W. H. Mennicke and N. Wetzelsberger, Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile, *Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol.*, **6**, 655-661 (1984).
- 11) P. Morazzoni, A. Montalbetti, S. Malandrino and G. Piffer, Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rat, *Eur. J. Drug Metab. Ph.*, **18**, 289-97 (1993).
- 12) D. Savio, P. Harrasser and G. Basso, Softgel capsule technology as an enhancer device for the absorption of natural principles in humans. A bioavailability cross-over randomized study on silybin, *Arzneimittel-Forsch.*, **48**, 1104-1106 (1998).